

# 粥状動脈硬化におけるリン脂質過酸化とグリケーションの分子機構

東北大学大学院農学研究科 教授 宮澤陽夫

## 要 旨

粥状動脈硬化における過酸化リン脂質 (PCOOH, phosphatidylcholine hydroperoxide) 生成とグリケーションの分子機構を明らかにする目的で、ウサギへの食餌性コレステロールおよびフルクトース負荷実験を行った。LDLコレステロール値の増加と血漿リポタンパク質濃度の増加に伴ってPCOOHが増加し、これが引き金になり粥状動脈硬化が発症した。さらにコレステロールとともにフルクトースを負荷するとグリケーションを介して膜脂質過酸化が促進され、粥状動脈硬化をさらに進行させることが明らかになった。血漿過酸化リン脂質の増加は動脈硬化の発症と進展に深く関与することがわかった。PCOOHは生体の酸化ストレスマーカーとして好適であることが示された。

キーワード：過酸化リン脂質、PCOOH、酸化LDL、コレステロール、粥状動脈硬化、グリケーション

## 1 はじめに

生体の酸化ストレスは粥状動脈硬化、糖尿病、癌など多くの疾病の原因と考えられる。粥状動脈硬化の発症において、リポタンパク質であるLDL粒子の過酸化は泡沫細胞形成の初期ステップとして重要である。我々は先にコレステロール負荷ウサギの動脈硬化病変部位にリン脂質ヒドロパーオキシドが蓄積していることを認め、粥状動脈硬化の発症にリポタンパク質粒子の膜リン脂質の過酸化が重要であることを見出した。

近年、グリケーション (glycation) が酸化ストレスを亢進すると考えられ注目されている[1,2]。糖尿病での高血糖状態では、生体内のタンパク質が非酵素的な糖化反応を受けやすい。この糖化反応は、その後期反応において活性酸素を生成することが知られている[3]。また、抗酸化酵素のひとつであるsuperoxide dismutase (SOD) は、glycationを受けると酵素活性が低下するという報告もある[4]。従って、glycationは脂質過酸化を促進する要因と考えられた。最近、われわれの研究グループはII型糖尿病では健常者に比べて血清PCOOH濃度が高値を示し、血清PCOOH濃度がヘモグロビンがglycationを受けて生じるヘモグロビンA1c (グリコヘモグロビン) と正相関することを明らかにした[5]。糖尿病患者や高齢者の血清や動脈硬化病変部位には、糖化最終生成物 [Advanced Glycation End-products (AGEs)] の一種であるcarboxymethyl lysine (CML) が蓄積しているという報告もある[6]。したがって、生体内でglycationが起きると脂質過酸化が促進され、粥状動脈硬化がより一層進展すると考えられた。

これまで、血液中の主要な糖質であるグルコースが体内でのglycationに関与すると考えられていた。

糖化反応では、還元糖のアルデヒド基やケトン基が、タンパク質のアミノ基やホスファチジルエタノールアミン (PE) のような脂質のアミノ基と反応する[7]。一方、甘味飲料に多く含まれるフルクトースは生理的条件下でグルコースよりopen-chain formの割合が多いため、約10倍グルコースより糖化反応を起こしやすいことが示されている[8]。

そこで本研究では、高血糖下でのglycationによる脂質過酸化の増悪化が粥状動脈硬化の進行の大きな要因であることを明らかにするために、コレステロール負荷ウサギにフルクトース水を与え、生体内での過酸化リン脂質生成とAGEsの蓄積を調べ、粥状動脈硬化に及ぼす影響の分子機構を明らかにしようとした。

## 2 実験方法

### (1) 実験動物と飼育条件

日本白色家兔 ( $n = 15$ ; 12週齢、体重約2 kg、雄) を、日本エスエルシー(株)から購入し、普通食・普通水群 (NN群)、コレステロール食・普通水群 (CN群) およびコレステロール食・フルクトース水群 (CF群) の3群に分けた。

動物は温度23℃前後、1日12時間の明暗サイクルの条件下で、個別ケージで飼育した。実験用固形飼料は船橋農場(株)から購入し、NN群にはウサギ用飼料RM-4を、コレステロール負荷群にはRM-4に1%コレステロールを添加した飼料を1日100gずつ与え、フルクトース負荷群にはさらに10%フルクトース水を飲用させ、8週間飼育した。なお、飲料水とフルクトース水は自由摂取とした。

### (2) 脂質の分析

採血は4週ごとに行い、血漿総コレステロール、LDLコレステロール、HDLコレステロール、及びトリグリセライドは、コレステロールE-テスト、LDLコレステロールテスト、HDLコレステロールテスト、及びトリグリセライドE-テストキット (和光純薬工業(株)) を用いてそれぞれ酵素比色法で測定した。血漿総脂質は、クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) を用いて、Folch法[9]により抽出した。

リン脂質濃度はバートレット法[10]にて測定した。これは、脂質を分解して脂質分子中の有機リンを全て無機リンに誘導し、その無機リンを比色定量する方法である。すなわち、抽出脂質 (血漿0.1ml当量) を試験管に分注し、60%過塩素酸水溶液を0.4ml加え、ブロックヒーターを用いて、200℃にて2時間加熱した。室温まで冷却後、水を4.2ml、5%モリブデン酸アンモニウム水溶液を0.2ml、アミドール溶液を0.2ml加え攪拌し、100℃にて15分加熱した。再度室温まで冷却後、830nmにて比色定量を行った。

8週間の飼育後、全てのウサギをネンブタール麻酔下 (1 mg/kg) で心臓採血し、大動脈弓部 (心臓から2 cm)、肝臓、腎臓を摘出し、素早くドライアイスで凍結後、使用するまで-80℃で保存した。

組織ホモジネートからの脂質抽出は、抗酸化剤として0.002% (w/v) ブチルヒドロキシトルエン (BHT) を含むクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) を用いて、Folch法にて血漿と同様に行った。各

組織のコレステロールは酵素法[11]で測定した。これはコレステロールオキシダーゼがコレステロールの3位のヒドロキシル基を脱水素する際に生じる過酸化水素を、ペルオキシターゼと共役させ蛍光物質に誘導し、蛍光定量する方法である。すなわち、150  $\mu$ g当量を30  $\mu$ lのイソプロピルアルコールに溶かして試験管に分注し、酵素液を0.5ml加え攪拌し、37°Cにて30分間加温した。この酵素液は、コレステロールオキシダーゼ (0.3U/ml)、コレステロールエステラーゼ (0.3U/ml)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (30U/ml)、コール酸ナトリウム (5 mM)、ポリエチレングリコール6000 (0.17 mM)、p-ヒドロキシフェニル酢酸 (0.15mg/ml)、PBS (pH7.0; 0.05M) を含む溶液である。反応後、0.5 N NaOHを1 ml加え反応を停止させ、励起波長 (Ex) 325nm、蛍光波長 (Em) 425nmにて1時間以内に測定した。標品はコレステロールを30  $\mu$ lのイソプロピルアルコールに溶かし、試料と同様に行い検量線を作成した。トリグリセライドは、組織10mg当量を試験管に分注し、0.05% Triton X-100で可溶性後、血漿と同様にトリグリセライドE-テストを用いて酵素比色法で測定した。リン脂質は組織6 mg当量を試験管に分注後、血漿と同様にパートレット法にて測定した。

### (3) 過酸化リン脂質、TBARSの測定

化学発光-高速液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) により、血漿、大動脈弓部、肝臓、腎臓の抽出脂質に含まれるホスファチジルコリンヒドロパーオキシド (PCOOH) とホスファチジルエタノールアミンヒドロパーオキシド (PEOOH) を測定した。このCL-HPLC装置は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と化学発光検出器 (CL) を組み合わせたものである[12-14]。HPLCによりホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) を他の脂質成分より分離後、別のポンプから送り込まれる発光試薬と過酸化物を反応させて両脂質中のヒドロパーオキシド基由来の化学発光を選択的に検出した。

なお、PCOOH標品は、L- $\alpha$ -phosphatidylcholine,  $\beta$ -oleyl- $\gamma$ -palmitoyl (Sigma) の光酸化により調製し、CL-HPLC法で検量線を作成した。

CL-HPLCの測定条件を以下に示した。

- ・ HPLCポンプ : 880-PU (日本分光工業社製)
- ・ HPLCカラム : Finepak SIL-NH<sub>2</sub>, 4.6 mmID×250 mm (日本分光工業社製)
- ・ 移動相 : イソプロピルアルコール/メタノール/水 (130/45/25, v/v/v)  
流速: 1.0 ml/min
- ・ カラムオープン : 860-CO (日本分光工業社製) 温度: 40°C
- ・ UV検出器 : 875-UV (日本分光工業社製) 検出波長: 210nm
- ・ 発光試薬 : 50mMホウ酸緩衝液 (pH 10) に 2  $\mu$ Mのルミノール (和光純薬工業(株)) と 25  $\mu$ Mのチトクロームc (Sigma, type VI) を溶解して作成 流速: 1.8ml/min
- ・ 化学発光検出器 : CLD-100 (東北電子産業社製)
- ・ 記録計 : クロマトコーダー21 (システムインスツルメンツ社製)

0.5mlの血漿から、クロロホルム/メタノール (2:1) を用いて、Folch法により脂質を抽出し、エバポ

レーターで濃縮乾固後、100  $\mu$ lのクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し、その内40  $\mu$ lをCL-HPLCに供した。

組織の場合は、20%ホモジネートを1 ml (200mg当量) 分取し、血漿と同様に脂質を抽出、濃縮後、400  $\mu$ lのクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解し、その内40  $\mu$ l (20mg当量) をCL-HPLCに供した。

血漿のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) は、1,1,3,3-テトラメトキシプロパンを標品として、八木法[15]にて測定した。血漿10  $\mu$ lに、1/12 N  $H_2SO_4$ を2 ml、10%リタングステン酸水溶液を250  $\mu$ l加え、攪拌、遠心分離 (3000rpm, 10min) した。上清を除去した後、1/12 N  $H_2SO_4$ を1 ml、10%リタングステン酸水溶液を150  $\mu$ l加え、攪拌、再び遠心分離 (3000rpm, 10min) した。上清を除去し、水を1 ml、0.67%TBA水溶液を500  $\mu$ l加え、攪拌し、沸騰湯浴中に60分間保った。冷却後、*n*-ブタノールを2.5ml加えて1分間攪拌し、遠心分離 (3000rpm, 10min) した。上層を励起波長 (Ex) 515nm、蛍光波長 (Em) 553nmの蛍光測定に供した。標品は50  $\mu$ lの標準液と1.95mlの水、ブランクは2 mlの水をそれぞれねじ口試験管に入れ、沸騰湯浴中に60分間保つ操作から試料と同様に行った。

組織のTBARSは、Ohkawa法[16]を改変した方法[29]に従い定量した。すなわち、ねじ口試験管に20%ホモジネートを0.2ml分取し、8.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を0.2ml、酢酸緩衝液 (pH 3.5) を1.5ml、0.8%BHT酢酸緩衝液を50  $\mu$ l、0.8%TBA水溶液を1.5ml、および水を0.6mlこの順に加えて密栓し、攪拌した。水中で1時間保った後、沸騰湯浴中で1時間保ち、氷で冷却し、水を1.0 ml、*n*-ブタノール/ピリジン (15:1, v/v) を5.0ml加えて混和した。その後、遠心分離 (3000rpm, 10min) し、上層の532nmの吸光度を測定した。ブランクは試料の代わりに水を0.2ml入れて同様の処理を行った。

#### (4) 動脈硬化巣の組織学的分析

大動脈弓部 (心臓から1.0cm) を摘出後、0.15 M NaClで洗浄し、50%ホルマリンで一晩固定後、パラフィン包埋した。ミクロトームにより5  $\mu$ mの厚さに切り出し、エラスティカ-マッソン (EM) 染色を行った。まず、脱塩水で洗浄後、ヘマトキシリン溶液にて核を染色した (5分間)。脱塩水で洗浄後、1%塩酸含有70%エタノールで分別し、ボンソー・キシリジン・酸フクシン・アゾフロキシシン混合液にて細胞質を染色した (5分間)。脱塩水で洗浄後、1%リンモリブデン酸水溶液中に5分間浸し、その後、0.4%アニリン青水溶液に5分間浸した。1%リンモリブデン酸溶液中に再び浸し (5分間)、1%酢酸水溶液で分別し、最後に脱塩水で洗浄し、脱水後、樹脂封入剤にて封入した。

#### (5) Advanced Glycation End-products (AGEs) の免疫染色

大動脈弓部 (心臓から1.5cm) を摘出後、0.15 M NaClで洗浄し、OCTコンパウンドで包埋後、100%アセトンで10分間固定し、使用するまで-80°Cで保存した。24時間後、クライオスタットにより5  $\mu$ mの厚さに切り出し、avidin-biotin complex (ABC) 法によりpyrraline、pentosidine、及びcarboxymethyl lysine (CML) の免疫染色を行った。リン酸緩衝化生理食塩水 (0.01 M PBS; pH 7.2) で洗浄 (5分×3回) しOCTコンパウンドを洗いながし、二次抗体の非特異的結合を防ぐために、10倍希釈したnormal horse serumを切片にのせ、室温に30分間放置した。その後、4°Cの氷枕の上で400倍希釈した一次抗体 (pyrraline, pentosidine, CML antibody made in mouse) をのせ、そのまま一晩放

置し、PBSで洗浄（5分×3回）後、1%過酸化水素を含むメタノールにてブロッキングを行った（20分、室温）。さらにPBSで洗浄（5分×3回）後、50倍希釈したHRP（horse radish peroxidase）標識化二次抗体（pyrraline, pentosidine, CML antibody made in horse）をのせ、室温に30分間放置し、0.002% $H_2O_2$ 含有DAB（3,3'-diaminobenzidine）溶液を用いて発色（1分）し、メチルグリーンにて核を染色（20分）した。最後に脱塩水で洗浄後、エタノールに5回、キシレンに4回漬けて脱水後、封入した。

#### (6) 統計処理

データはMean±SEで表し、ANOVAにて解析した。

### 3 実験結果

#### (1) 大動脈弓部の粥状動脈硬化病変

Fig. 1には、ウサギの大動脈弓部のエラスティカ-マッソン（EM）染色の結果を示した。1%コレステロール/10%フルクトース水負荷（CF群）により、1%コレステロール負荷（CN群）よりも、粥状動脈硬化がさらに進展することが明らかになった。

#### (2) ウサギ血漿中の脂質組成の変化

ウサギ血漿中の総コレステロール（TC）、LDLコレステロール（LDL-C）、HDLコレステロール（HDL-C）、トリグリセライド（TG）、リン脂質（PL）の変化をFig. 2に示した。フルクトース負荷により、TGがさらに増加傾向にあった。なお、フルクトース負荷は、血漿コレステロール濃度に影響を与えなかった。

#### (3) ウサギ血漿中の過酸化リン脂質とTBARSの変化

ウサギ血漿中のPCOOHとTBARSの変化をFig. 3に示した。CF群のPCOOHは飼育8週目にCN群より有意に増加した。CF群のTBARSはCN群に比べ増加傾向にあったが統計的に有意差は認められなかった。

#### (4) ウサギ組織の脂質組成

ウサギ大動脈弓部の脂質組成をFig. 4に示した。粥状動脈硬化が進展するのに伴い、大動脈弓部にコレステロールとトリグリセライドの蓄積することが明らかになった。一方、リン脂質濃度に違いは認められなかった。

ウサギ肝臓の脂質組成をFig. 5に示した。コレステロール負荷により、組織中のコレステロールとトリグリセ

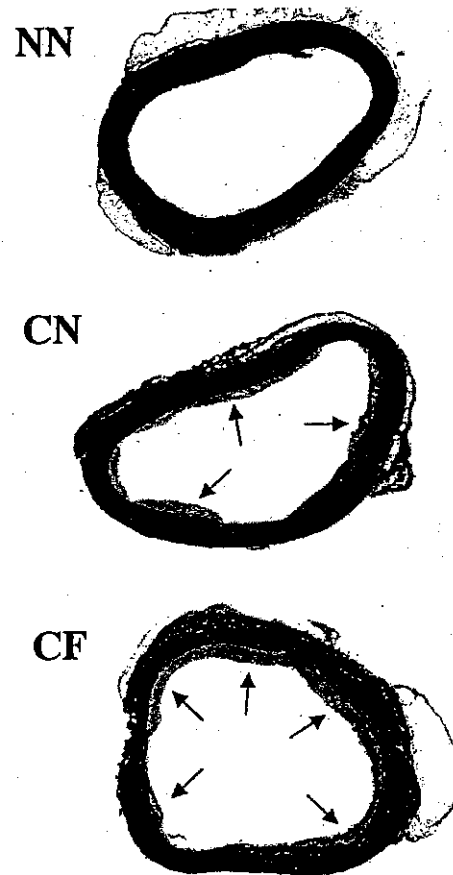


Fig. 1 Atherosclerotic lesion of rabbit aorta (elastica-masson staining).

NN: Normal diet group

CN: 1% Cholesterol diet group

CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group

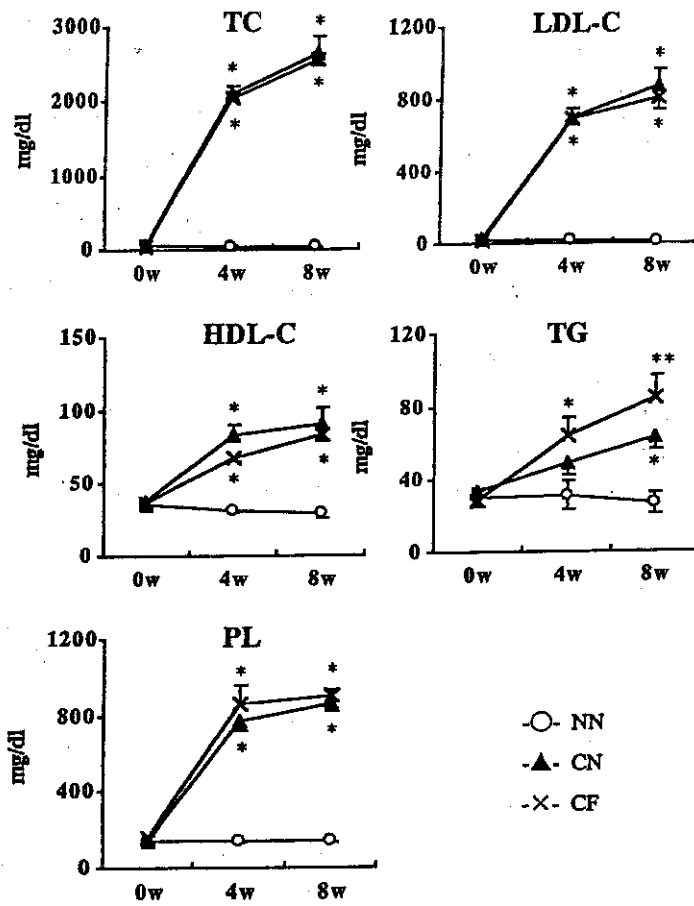


Fig. 2 The change of plasma lipid composition. Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group. HDL-C: HDL-cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; PL: phospholipids; TC: total cholesterol; TG: triglycerides. NN: Normal diet group  
CN: 1% Cholesterol diet group  
CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group  
\* $p < 0.05$  vs. NN  
\*\* $p < 0.05$  vs. CN

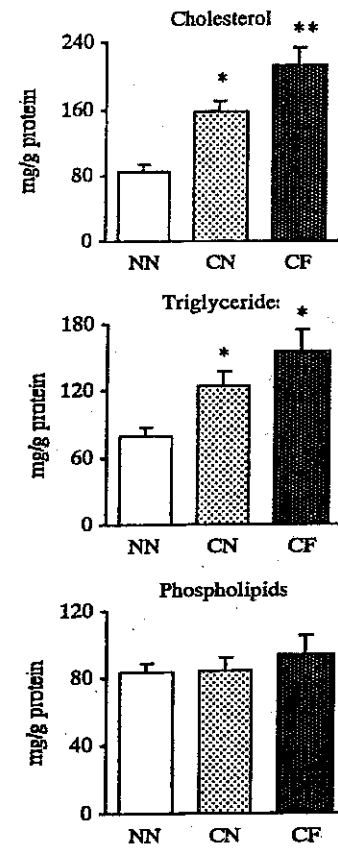


Fig. 4 Lipid composition of rabbit aorta. Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group. NN: Normal diet group  
CN: 1% Cholesterol diet group  
CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group  
\* $p < 0.05$  vs. NN  
\*\* $p < 0.05$  vs. CN

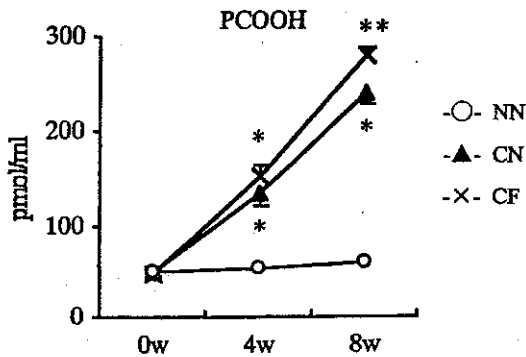
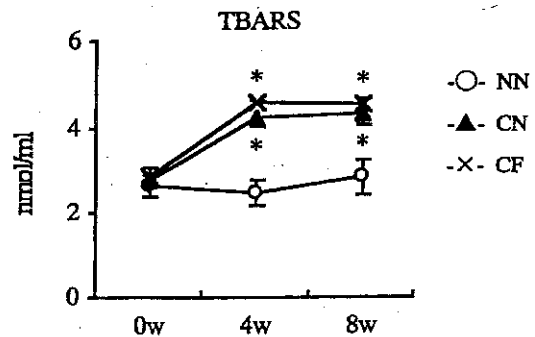


Fig. 3 The change of plasma PCOOH and TBARS levels. Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group. PCOOH: phosphatidylcholine hydroperoxide; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. NN: Normal diet group  
CN: 1% Cholesterol diet group  
CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group  
\* $p < 0.05$  vs. NN  
\*\* $p < 0.05$  vs. CN



ライド含量が増加したが、フルクトース負荷は肝臓の脂質組成に影響を与えなかった。リン脂質濃度は、3群間に違いは認められなかった。また、腎臓の脂質組成もフルクトースの影響を受けなかった (Fig. 6)。

### (5) ウサギ組織の過酸化リン脂質

ウサギ大動脈弓部の過酸化リン脂質をFig. 7に示した。粥状動脈硬化病変が進展したCF群の大動脈弓部には、CN群に比べ、PCOOHの有意な蓄積を認めた。PEOOHもCF群で増加傾向にあったが、CN群と比べて統計的な違いは認められなかった。

一方、肝臓と腎臓では、PCOOHとPEOOHともに、CF群で増加傾向にあったが、CN群と比べて統計的に有意差は認められなかった (Fig. 8)。

### (6) ウサギ組織のTBARS

ウサギ組織 (大動脈弓部、肝臓、腎臓) のTBARSをFig. 9に示した。各組織ともCF群はCN群に比べ増加傾向にあったが、統計的に有意差はなかった。

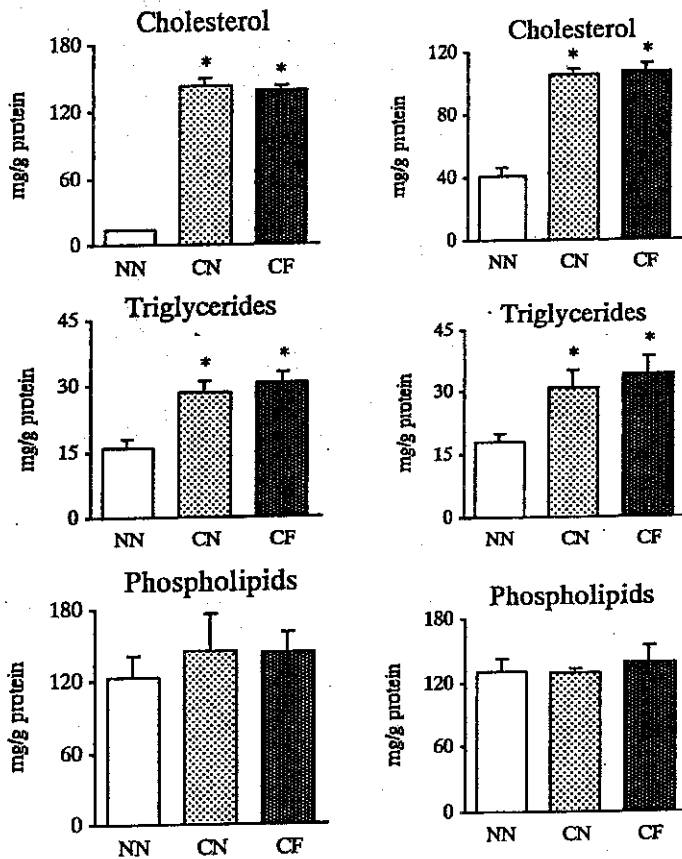


Fig. 5 Lipid composition of rabbit liver.

Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group.  
 NN: Normal diet group  
 CN: 1% Cholesterol diet group  
 CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group  
 \* $p < 0.05$  vs. NN

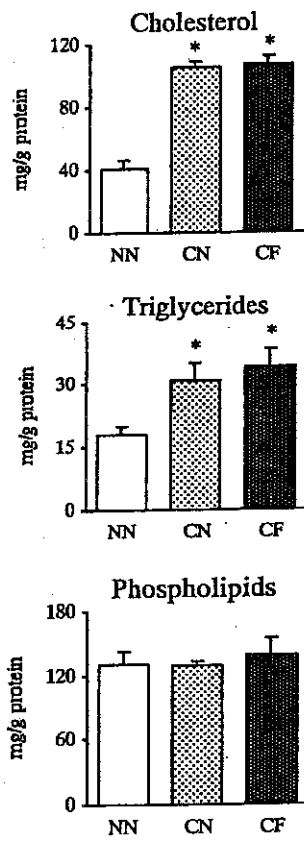


Fig. 6 Lipid composition of rabbit kidney.

Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group.  
 NN: Normal diet group  
 CN: 1% Cholesterol diet group  
 CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group  
 \* $p < 0.05$  vs. NN

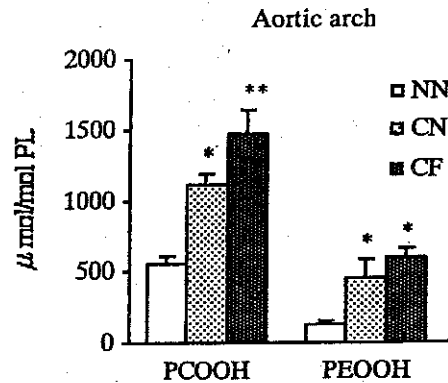


Fig. 7 Phospholipid hydroperoxides of atherosclerotic lesions in rabbit aorta.

Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group. PCOOH: phosphatidylcholine hydroperoxide; PEOOH: phosphatidylethanolamine hydroperoxide; PL: phospholipids.  
 NN: Normal diet group  
 CN: 1% Cholesterol diet group  
 CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group  
 \* $p < 0.05$  vs. NN  
 \*\* $p < 0.05$  vs. CN

(7) 動脈硬化病変へのAGEsの蓄積

ウサギの大動脈弓部のAGEs (pyrraline、pentosidineおよびCML) の免疫染色の結果をFig. 10、Fig. 11、Fig. 12にそれぞれ示した。コレステロール負荷だけでも血管内膜にAGEsが染まり、CF群では動脈硬化巣(内膜)にさらに強く染まることが明らかになった。

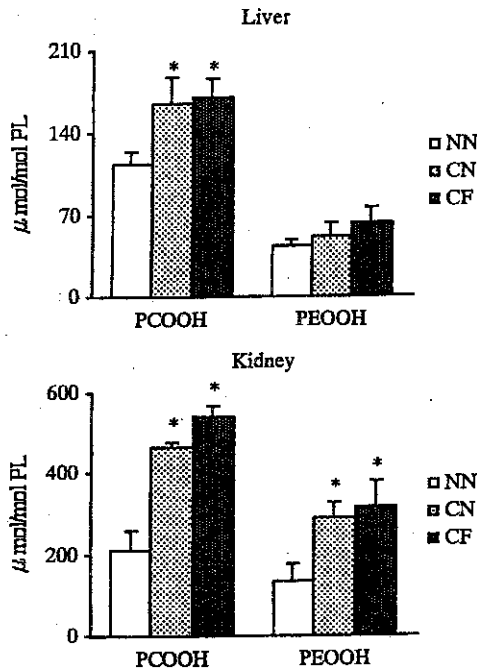


Fig. 8 Phospholipid hydroperoxides of rabbit liver and kidney.

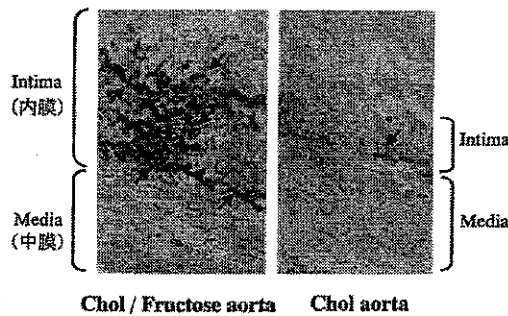
Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group. PCOOH: phosphatidylcholine hydroperoxide; PEOOH: phosphatidylethanolamine hydroperoxide; PL: phospholipids.

NN: Normal diet group

CN: 1% Cholesterol diet group

CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group

\* $p < 0.05$  vs. NN



Sample: rabbit aorta frozen section  
Original magnification  $\times 200$

Fig. 10 Immunostaining of pyrraline.

Chol: 1% Cholesterol diet group

Chol / Fructose: 1% Cholesterol diet / 10% fructose water group

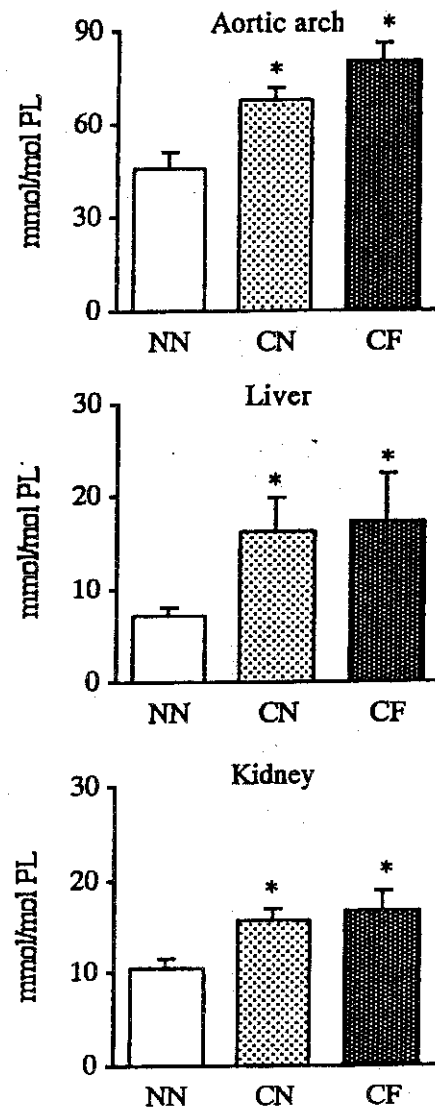


Fig. 9 The level of TBARS of rabbit tissues. Results are mean  $\pm$  SE of five rabbits for each group. PL: phospholipids; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

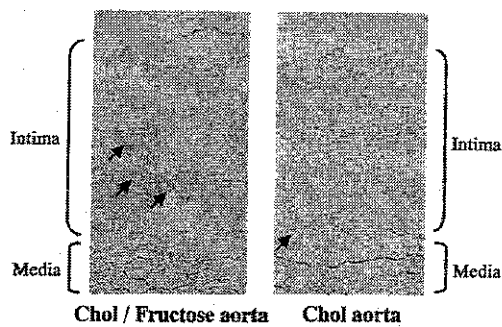
NN: Normal diet group

CN: 1% Cholesterol diet group

CF: 1% Cholesterol diet / 10% Fructose water group

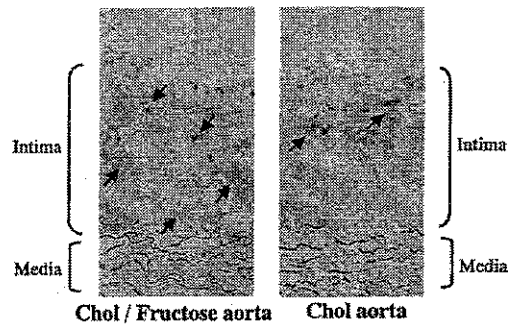
\* $p < 0.05$  vs. NN





Sample : rabbit aorta frozen section  
Original magnification  $\times 200$

Fig. 11 Immunostaining of pentosidine.  
Chol: 1% Cholesterol diet group  
Chol / Fructose: 1% Cholesterol diet / 10% fructose water group



Sample : rabbit aorta frozen section  
Original magnification  $\times 200$

Fig. 12 Immunostaining of carboxy methyl lysine.  
Chol: 1% Cholesterol diet group  
Chol / Fructose: 1% Cholesterol diet / 10% fructose water group

#### 4 考 察

本研究では、glycationによる脂質過酸化の増悪化が粥状動脈硬化を一層進展させることを、フルクトース負荷ウサギを用いることにより検証しそれを明らかにした。生体内でglycationを促進させるためにフルクトースを使用した理由は、in vitroの研究でフルクトースはグルコースより強いglycating agentであり、Advanced Glycation End-products (AGEs) の形成作用が約10倍強いことが示されていて[8]、フルクトース摂取が生体内へのAGE蓄積を促進させるのではないかと考えたからである。

Glycationが脂質過酸化に関与しこれを促進させるという報告は数多くある。当研究室でも、II型糖尿病では健常者に比べ血清PCOOH濃度が増加し、また血清PCOOH濃度とヘモグロビンA1cが正相関することを明らかにした[5]。この報告は、糖尿病に膜脂質過酸化が関与することを臨床レベルで確認した極めて重要な論文である。Taniguchiら[4]は、抗酸化酵素の一つであるsuperoxide dismutase (SOD) がglycationを受けると酵素活性が低下すると報告している。また、タンパク質のglycationにより、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素が生成し、細胞を構成している膜脂質を酸化する可能性がある[3]。生体膜を構成しているリン脂質は不飽和脂肪酸を多く含むので酸化を受けやすく、酸化されると脂質過酸化の第一次生成物であるリン脂質ヒドロパーオキシド (PLOOH) を生じる。このPLOOHからは第二次生成物として反応性の高いアルデヒドやカルボニル化合物、Lyso PCが形成される。このアルデヒドやカルボニル化合物はタンパク質と非酵素的に反応して架橋を形成するので、AGEの生成を促進する可能性がある。実際、AGEの一種であるcarboxymethyl lysine (CML) は脂質過酸化によっても生じることが報告されている[17]。本研究では、脂質過酸化の第一次生成物であるPLOOHを宮澤らが開発したCL-HPLC法で定量し、第二次生成物をTBA法で測定した。血漿中のPCOOH濃度はコレステロール食だけでも大きく増加し、フルクトース負荷によりさらに有意に増加した。TBARSはコレステロール食で有意に増加したが、フルクトースの

影響は確認されなかった。この測定結果の違いは、生体内では、過酸化脂質はヒドロパーオキシドの形で蓄積すること、ヒドロパーオキシドは比較的安定であること、それから、測定の特異性と検出感度の違いが考えられた。したがって、ヒドロパーオキシド量を定量することが、生体内の酸化ストレスを正確に評価する上で重要であると考えられた。

また我々は、フルクトースによりPCOOHが増加するメカニズムを明らかにするため、glycationの指標である大動脈弓部でのAGEsの免疫染色を行った。フルクトースやグルコースなどの還元糖は、タンパク質と反応して最終的にAGEsを形成する。今回、粥状動脈硬化病変部位について、AGEs (pyrraline, pentosidine and CML) 蓄積の組織学的検討を行ったところ、コレステロール食群にもAGEsの蓄積が確認され、フルクトース負荷ウサギではさらに強く染まることが明らかになった。Imanagaら[18]は、非糖尿病患者の動脈硬化病変部位に、glycated LDLとCMLが蓄積していることを報告している。また、ストレプトゾトシン糖尿病ラットでは、高血糖に伴うpolyol pathwayの活性化により、目のレンズでのフルクトース濃度が増加し、glycation (fructation) によりAGE化したcrystallinsが増加したという報告がある[19]。本研究では、血漿や血管壁でのglycationが膜リン脂質の過酸化を促進し、過酸化リン脂質の蓄積により粥状動脈硬化がより進展したのではないかと考えられた。

本研究では、フルクトース摂取により血漿中のTG濃度の増加が観察された。Romsosら[20]は、ラットにフルクトースを摂取させることにより肝臓での脂肪合成が亢進することを報告している。したがって、フルクトースはグルコースに比べ、glycationを起こしやすいだけでなく、血中のTGを増加させやすいことがわかった。今回、肝臓でのTG増加は認められなかったが、血漿や動脈硬化病変部位でのTG沈着の増加という脂質自体の増加が、PLOOHの増加に関与する可能性が考えられた。

本研究により、高コレステロール食はLDLコレステロールの増加と血漿リポタンパク質量の増加に伴うPCOOHの増加により、粥状動脈硬化を発症し増悪化させることがわかった。さらにフルクトースを与えると、グリケーションを介して脂質過酸化が促され粥状動脈硬化をさらに進行させることが明らかになった。これらの知見から、血漿コレステロールの増加だけでなく血漿過酸化リン脂質の増加が動脈硬化の発症と進展に深く関与すると考えられた。近年、AGE産生と相互に関連して起こる生体内酸化ストレスの亢進が、糖尿病性の動脈硬化や合併症の発症、及びその進展機序として注目されている。その点においても、フルクトース負荷ウサギの糖尿病性動脈硬化のモデル動物としての有用性が示唆された。

フルクトースの摂取は主に砂糖としてなされるが、我が国ではこの20年間で大幅に増加している。ジュースや菓子類に多く含まれており、幼児期から長年摂取するためその健康への影響に留意する必要がある。今日の食糧産業におけるフルクトースの利用を考えれば、健常者や糖尿病患者の安全なフルクトース摂取量を明らかにするためにも、さらなる長期的かつ基盤的な研究が必要と考えられた。

## 5 参考文献

- (1) Meng J, Sakata N, Takebayashi S, Asano T, Futata T, Nagai R, Ikeda K, Horiuchi S, Myint T, Taniguchi N : Glycooxidation in aortic collagen from STZ-induced diabetic rats and its relevance to vascular damage. *Atherosclerosis* 1998; 136: 355-65.
- (2) Odetti P, Pronzato MA, Noberasco G, Cosso L, Traverso N, Cottalasso D, Marinari UM : Relationships between glycation and oxidation-related fluorescences in rat collagen during aging. *Lab Invest* 1994; 70: 61-7.
- (3) Smith PR, Thornalley PJ : Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycated proteins under physiological conditions. Studies with the model fructosamine, N epsilon-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) hippuryl-lysine. *Eur J Biochem* 1992; 210: 729-39.
- (4) Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N : Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycated sites. *J Biol Chem* 1987; 262: 16969-72.
- (5) Nagashima T, Oikawa S, Hirayama Y, Tokita Y, Sekikawa A, Ishigaki Y, Yamada R, Miyazawa T : Increase of serum phosphatidylcholine hydroperoxide dependent on glycemic control in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, submitted
- (6) Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG : Increased accumulation of the glycooxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; 99: 457-68.
- (7) Oak J, Nakagawa K, Miyazawa T : Synthetically prepared Aamadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid peroxidation via free radical reactions. *FEBS Lett* 2000; 481: 26-30.
- (8) Bunn HF, Higgins PJ : Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 1981; 213: 222-4.
- (9) Folch J, Lees M, Stanley GHS : A simple for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
- (10) Bartlett GR : Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; 234: 466-8.
- (11) Heider JG, Boyett RL : The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture. *J Lipid Res* 1978; 19: 514-8.
- (12) Miyazawa T, Fujimoto K, Suzuki T, Yasuda K : Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1994; 233: 324-32.
- (13) Miyazawa T, Suzuki T, Fujimoto K, Yasuda K : Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and

- brain of the rat. *J Lipid Res* 1992; 33: 1051-9.
- (14) Miyazawa T : Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. *Free Radic Biol Med* 1989; 7,: 209-17.
  - (15) Yagi K. : A simple fluorometer assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976; 15: 212-6.
  - (16) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8
  - (17) Nerlich AG, Schleicher ED : N (epsilon)-(carboxymethyl) lysine in atherosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress. *Atherosclerosis* 1999; 144: 41-7.
  - (18) Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S, Matsunaga A, Sasaki J, Arakawa K, Nagai R, Horiuchi S, Itabe H, Takano T : In vivo and in vitro evidence for the glycoxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000; 150: 343-55.
  - (19) Kawasaki Y, Fujii J, Miyazawa N, Hoshi A, Okado A, Tano Y, Taniguchi N : Specific detections of the early process of the glycation reaction by fructose and glucose in diabetic rat lens. *FEBS Lett* 1998; 441: 116-20.
  - (20) Rosos DR, Leveille GA : Effect of dietary fructose on in vitro and in vivo fatty acid synthesis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1974; 360: 1-11.